Münster i/W. 1934. No 92 Med Diss.

Aus dem Hygienischen Institut der Medizinischen Akademie
in Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Manteufel.

Versuch einer Verbesserung der Methodik der Züchtung von Tuberkelbazillen aus dem fließenden Blut

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Würde eines doctor medicinae
durch die Medizinische Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster
in Gemeinschaft mit
der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

vorgelegt von
HANS HELMKE
aus Düsseldorf.

1934

DISSERTATIONS-VERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität
in Gemeinschaft mit der Medizinischen Akademie in Düsseldorf.

gez. Schmidt
Rektor der Medizinischen Akademie Düsseldorf

gez. Esch
Dekan der Medizinischen Fakultät Münster

Manteufel
1. Berichterstatter

Vogt
2. Berichterstatter

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die hier mitgeteilten Versuche zur Züchtung von Tuberkelbakterien aus dem Blut nach den Angaben von Löwenstein schließen sich an frühere Untersuchungen im Institut an, die von Holtgrave 1932 und von Kottmann 1933 in einer Dissertation mitgeteilt sind*). Während die Untersuchungen an experimentell infizierten Kaninchen und Meerschweinchen, die an den einzelnen Tieren zu wiederholten Malen ausgeführt wurden, unter zahlreichen negativen Ergebnissen auch einige positive lieferten, fielen die Untersuchungen bei tuberkulösen Patienten ganz anders aus, als nach den günstigen Berichten von Löwenstein zu erwarten war.

Obwohl die betreffenden Untersuchungen auf der genauen Befolgung der damaligen Methodik von L. fußten, erhob sich doch die Frage, ob eine Verbesserung der Methodik bessere Ergebnisse zeitigen würde.

Eine Überlegung, die sich ohne weiteres ergibt, geht wohl dahin, daß die Eignung des Blutzentrifugates für Kulturzwecke oder vielmehr sein Gehalt an ausgeschleuderten Tuberkelbakterien wesentlich von der Leistungsfähigkeit der Zentrifuge abhängig ist. Daraus ergab sich der Gedanke durch Präcipitatbildung in der Blutlösung die Sedimentation und Ausschleuderung der Tuberkelbakterien zu erleichtern. Auf diesem Gedanken beruhen schon frühere Verfahren bei der Anreicherung der Tuberkelbakterien und neuerdings die Methode von Hill**), nämlich durch Ausflockung von Bariumchlorid mit Schwefelsäure die Niederschlagsbildung, und damit auch die Sedimentierung von Tuberkelbakterien zu verstärken.

Ich habe die Aufgabe übernommen, durch Globulinausflockung in der Blutlösung mittels gasförmiger Kohlensäure die Niederschlagsbildung und die Nachweisbarkeit vereinzelter Tuberkelbakterien zu verbessern.

Um die Brauchbarkeit des Verfahrens sicherzustellen, wurden zunächst folgende Vorversuche unternommen:

I. Von je 10 ccm frisch aus der Cubitalvene entnommenem menschlichem Blut wurden je 5 ccm in 2 weiten, mit je 30 ccm destilliertem, sterilisiertem Wasser gefüllte Zentrifugalröhrchen aufgefangen. Durch sofortiges Schütteln wurde eine gleichmäßige Hämolyse herbeigeführt und das Röhrchen bis zu je 50 ccm Gesamtinhalt mit sterilem Wasser aufgefüllt. In das eine dieser Röhrchen wurde nun

---

*) Vorläufige Bekanntgabe dieser Befunde von Manteufel in der Med. Kl. 1932 (Umfrage Meyer), Zeitschrift Immunitätsf. 1932, Münch. Med. Wo. 1933.

**) Hill, Münch, Med. Wo. 1931 I, S. 974.

mittels steriler Glasröhre ein kräftiger Strahl gasförmiger Kohlensäure hineingeleitet, dann beide scharf zentrifugiert, d. h. 10 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute. Nun wurde das über dem Sediment stehende rötlich gefärbte Wassser abgegossen; die Zentrifugengläser wurden nun mit sterilem Wasser wieder aufgefüllt und von neuem zentrifugiert. Dieses „Waschen" des Sedimentes wurde noch zweimal wiederholt. Dabei zeigte sich, daß 1. beide Sedimente gleichmäßig von Hämoglobin befreit waren, daß sie aber eine graurötliche Farbe aufwiesen, und sich das zuletzt zugesetzte Wasser nur mehr wenig verfärbte. Dieses Ergebnis ist insofern wichtig, als nach Untersuchungen Löwenstein's die Anwesenheit von Hämoglobin im zu verarbeitenden Material das Wachstum von Tuberkelbakterien hemmen oder unmöglich machen kann. 2. ergab sich aus diesem Vorversuch, daß das mit einem Kohlensäurezusatz gewonnene Sediment entschieden reichlicher war, sich ferner auch hinsichtlich seiner Konsistenz — es war ein gleichmäßiger, lockerer Brei — mehr zur Weiterverarbeitung eignete, als das ohne Gaszusatz gewonnene.

Diese Ergebnisse bestätigten sich in mehreren Kontrollversuchen, die auf die gleiche Weise angestellt wurden.

II. Die zweite Versuchsreihe sollte zeigen, ob bei dieser verhältnismäßig komplizierten Arbeitsweise das zu verarbeitende Material mit Sicherheit steril bleiben würde — vollständige Keimfreiheit ist zur Züchtung von Tuberkelbazillen unbedingt erforderlich —, und ferner, ob durch die Behandlung mit Kohlensäure die Sterilität der zu verimpfenden Masse irgendwie beeinträchtigt würde. Zu diesem Zwecke wurden nach der in Versuch I angegebenen Methode wiederum von 10 ccm Blut vom gesunden Menschen je 5 ccm auf 6—8 mit Löwenstein'schem Nährboden beschickte Reagenzgläser übertragen. Auf der Oberfläche der Nährmasse wurde das Material dann gleichmäßig verteilt und mit der benutzten Pipette leicht hineinmassiert. Es zeigte sich nun, daß bei zehn solcher Art angestellten Versuchen, bei denen also insgesamt etwa 120 Röhrchen beimpft wurden, 5 Röhrchen nach 2—3 Tagen Aufenthalt im Brutschrank ein Wachstum aufwiesen, und zwar handelte es sich in allen Fällen um Verunreinigungen. Von diesen 5 verunreinigten Röhrchen gehörten zwei der ohne Kohlensäure sedimentierten Serie desselben Patienten an, die anderen drei stammten aus verschiedenen Serien, und zwar handelte es sich bei zweien um mit Kohlensäure vorbehandelte Sedimente. Dieser Versuch zeigt also, daß zwar durch Verarbeitung mit Kohlensäure die Sauberkeit der Kulturen nicht beeinflußt wird, daß jedoch bei der angewandten Arbeitsweise eine gelegentliche Verunreinigung nicht mit Sicherheit zu vermeiden ist.

III. Daher wurde nun in einer dritten Versuchsreihe zum Waschen der Sedimente nicht nur steriles Wasser benutzt, sondern eine Hälfte des ganzen Materials wurde anstatt dreimal mit sterilem Wasser 3 mal mit 3%iger Essigsäure gewaschen, also nur zur ersten Hä-

molyse steriles Wasser benutzt. Dabei zeigte sich, daß die so vorbehandelten Sedimente weniger voluminös und auch hinsichtlich ihrer Konsistenz weniger gleichmäßig waren als diejenigen, zu deren Verarbeitung nur Wasser benutzt worden war, sodaß sie also zur Verimpfung auf Nährböden viel weniger geeignet erschienen *). Ferner war die Möglichkeit zu bedenken, daß in ihrer Säurefestigkeit beeinträchtigte Tuberkelbakterien im Blut vorkommen könnten, und diese dann durch die Essigsäure in ihrem Wachstum ungünstig beeinflußt oder gar abgetötet werden könnten. Trotz dieser beiden Einwände wurde aber dann bei der eigentlichen Arbeit für die Hälfte der verarbeiteten Sedimente das Waschen mit Essigsäure beibehalten, sodaß sich also an Hand der Ergebnisse der drei Vorversuche nun folgende Arbeitsmethode endgültig ergab:

Von jedem Patienten wurde mittels steriler Rekordspritze aus der gestauten Cubitalvene 10 ccm Blut entnommen und in 2 ca. 50 ccm fassenden Zentrifugenröhrchen zu je 5 ccm in sterilem Aqua dest. hämolysiert. In beide Röhrchen wurde nun mittels steriler Glasröhre ein kräftiger Strahl Kohlensäure hineingeleitet, und die Lösung mit demselben Glasstab kräftig verquirlt. Dann wurde nach scharfem ca. 15 Minuten langem Zentrifugieren das eine Sediment dreimal mit 3%iger steriler Essigsäure, das andere dreimal mit sterilem Wasser in der oben angegebenen Weise gewaschen. Die nach dem letzten Dekantieren dickbreiigen, gräulich gefärbten Sedimente wurden nun durch Ansaugen mittels weitmäuliger steriler Pipette aufgenommen und auf Löwenstein'sche Nährböden übertragen; und zwar wurden zur Verimpfung des mit Essigsäure gewaschenen Materials 3—4, zu dem mit Wasser gewaschenen 4—6 mit Löwenstein'schem Nährboden beschickte Reagensgläser benötigt. Auf der Oberfläche des Nährbodens wurde die verarbeitete Masse mit derselben Pipette gleichmäßig verteilt und dann vorsichtig hineinmassiert, ohne jedoch die Oberfläche zu verletzen. Benutzt wurden abwechselnd mit Kongorot und Malachitgrün versetzte Nährböden, die nach den Angaben Löwenstein's im Sonderdruck der Medizinischen Klinik (Umfrage Meyer) 1932 angefertigt wurden, sich also folgendermaßen zusammensetzten:

0,4 g einfach saures Kaliumphosphat.
0,2 g zitronensaures Natrium.
0,2 g Magnesium sulfuricum.
4,0 g Asparagin.
60,0 g Glycerin.
1000,0 g Wasser.

Zu je 150 g dieser Lösung wurde dann noch zugegeben:

12,0 Glycerin
6,0 Kartoffelmehl
4 Eier

*) vgl. die Versuche Busson's der Sedimentierung und Hämolyse mit Saponin. Z. f. B. Originale Bd. 124 Heft 7/8.

1 Eidotter
10,0 Kongorotlösung (2%)
bezw. 5,0 Malachitgrünlösung (2%).

Die Eier haben vorher 30 Minuten in einer Schmierseifen-Sodalösung und 20 Minuten in 1‰ Sublimatlösung gelegen.

Nach dem Verimpfen wurden die Röhrchen — es wurden von den untersuchten 40 Fällen insgesamt etwa 320 Kulturen angelegt — mittels Paraffinstopfen luftdicht verschlossen und 8 Tage lang in horizontaler Lage im Brutschrank von 37° gehalten. In dieser Zeit war das Sediment durchweg gut angetrocknet, sodaß die Röhrchen dann zwecks Raumersparnis senkrecht gestellt werden konnten. Alle Röhrchen wurden ungefähr 8 Monate lang beobachtet. Drei Wochen nach Verarbeitung wurde die erste makroskopische Kontrolle vorgenommen, es zeigte sich auf keinem Röhrchen ein Wachstum. Die erste mikroskopische Kontrolle — es wurde von jedem Röhrchen mittels Platinöse ein Abstrich gemacht und nach Ziehl-Neelsen gefärbt — führte zu demselben Resultat; dieselben Untersuchungen wurden alle 6—8 Wochen wiederholt, jedoch zeigte sich niemals weder ein makroskopisches noch ein mikroskopisches Wachstum.

Die zur Untersuchung gelangten Fälle verteilten sich auf die einzelnen Krankheitsbilder der Tuberkulose folgendermaßen:

1. Chronische Lungentuberkulose und käsige Pneumonie:
   28 Fälle.
   Es handelt sich durchweg um Patienten mit schwersten Krankheitsbildern; 6 Monate nach der Blutentnahme waren von 28 Patienten bereits 24 gestorben.
2. Lungen- und Darmtuberkulose:
   1 Fall.
   Bei der Sektion (1 Woche nach Blutentnahme) zeigten sich auch in den meisten anderen Organen tuberkulöse Herde.
3. Miliare Lungenaussaat:
   1 Fall.
   5 Tage nach Blutentnahme gestorben.
4. Allgemeine Miliartuberkulose:
   1 Fall.
   Exitus 12 Tage nach Blutentnahme. Diagnose durch Sektion bestätigt.
5. Meningitis tuberculosa:
   1 Fall.
   2 Tage nach Blutentnahme gestorben.
6. Einseitige Nierentuberkulose:
   1 Fall,
   durch Urinkultur nachgewiesen und durch Operation bestätigt. Klinisch-röntgenologisch kein Lungenbefund.

7. Knochentuberkulose (Wirbelsäule):

1 Fall.

8. Drüsentuberkulose der Hals- und Hilusdrüsen, sonst klinisch-röntgenologisch kein Befund:

1 Fall.

9. Lupus vulgaris:

4 Fälle,
alle 4 Fälle bestanden seit mehr als 2 Jahren.

10. Lupus erythematodes:

1 Fall.

Bei 5 Fällen der Gruppe 1., ferner bei Fall 3., 4. und 10 wurde außerdem vor der Verimpfung ein kleiner Teil des Sedimentes auf mehrere Objektträger ausgestrichen und nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Auch dabei wurden bei der mikroskopischen Untersuchung niemals Tuberkelbakterien gefunden.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde noch in zwei Fällen nach der gleichen Methode Leichenblut verarbeitet und zwar von 2 Fällen der Gruppe 1. Beide Patienten waren an chronischer Lungentuberkulose gestorben, bei der Sektion wurden über die ganze Lunge verteilt frische und alte Herde nebst zahlreichen Kavernen gefunden. Durch Herzpunktion wurden im einen Fall 3, im anderen 4 Stunden nach dem Tode 10 ccm Blut entnommen und in ähnlicher Weise wie bei den lebenden Patienten Sedimente daraus gewonnen, nur wurde zum Auswaschen lediglich 3%ige Essigsäure und nicht Wasser verwandt.

Nach 25 Tagen hatten sich im ersten Fall auf sieben von acht beimpften Röhrchen größere und kleinere Kolonien entwickelt. Es handelte sich um trockene, bröckelige Erhebungen von runder Form, die größten etwa 4 mm hoch und von ebenso großem Durchmesser, die Farbe gelblich-weiß oder grau-weiß. Bei der mikroskopischen Untersuchung der nach Ziehl-Neelsen gefärbten Abstriche der Kolonien erwiesen sich diese als Reinkolonien von sehr feinen, säurefesten, z. T. leicht gekrümmten Stäbchen, also nach ihrem Wachstum, mikroskopischen und makroskopischen Aussehen, ihrem färberischen Verhalten um echte Tuberkelbakterien. Auch bei Übertragung dieser Kolonien auf neue Löwenstein'sche Nährböden zeigte sich nach weiteren drei Wochen wieder typisches Wachstum von Tuberkelbakterien.

Bei dem zweiten Fall dieser Art zeigten sich 32 Tage nach der Verimpfung auf 2 von 6 angelegten Röhrchen ähnliche Kolonien. Auch diese ließen sich makroskopisch, mikroskopisch und färberisch einwandfrei als Tuberkelbakterien identifizieren und durch Abimpfung weiterzüchten.

Das Problem der praemortalen oder letalen Aussaat soll hier unberührt bleiben. Aus dem Ergebnis der Versuche soll lediglich der

Schluß gezogen werden, daß die angewandte Methode zur Züchtung von Tuberkelbakterien an sich geeignet war. Damit würde der Haupteinwand, den man in Anbetracht des krassen Unterschiedes zwischen den Ergebnissen Löwenstein's und den hier angeführten machen könnte, immerhin eingeschränkt, nämlich, daß der Grund für den Mißerfolg in der mangelhaften Methode zu suchen sei. Außerdem muß zu diesem Punkt erwähnt werden, daß mir zwei Kollegen, die sich in Wien selbst im Löwenstein'schen Institut mit Löwenstein's Methoden vertraut gemacht haben, bei den Arbeiten beratend zur Seite standen, und so engste Anlehnung an die Löwenstein'sche Arbeitsweise gewährleistet wurde.

Zusammenfassung.

Es ist der Versuch gemacht worden, die Ergebnisse der Blutkultur von Tuberkelbakterien nach den Angaben von Löwenstein, die nach den vorausgegangenen Untersuchungen von Holtgrave und Kottmann im Institut bei weitem nicht so günstig waren, durch Änderung der Methodik zu verbessern. Dabei wurde einmal ganz von der Behandlung der Blutlösung mit Säure Abstand genommen, wie es Löwenstein neuerdings auch selbst vorgeschlagen hat, und zweitens die Sedimentierung in der Blutlösung durch Ausfällung der Globuline mittels Kohlensäuregas verstärkt. Trotzdem ist eine Steigerung der positiven Befunde nicht zu verzeichnen gewesen. Bei im ganzen 40 untersuchten Patienten wurde weder mit diesem noch mit dem Kontrollverfahren ein positiver Blutbefund erhoben. Somit ist also die Annahme, daß durch Praecipitatbildung eine Verbesserung der positiven Ergebnisse erzielt werden könnte, in praktischer Hinsicht nicht in Erscheinung getreten. Das Ergebnis spricht also für die bisherige Auffassung, daß die Häufigkeit züchtbarer Tuberkelbakterien im Blut nicht so groß ist, wie es nach den Arbeiten von Löwenstein zu erwarten war.

LITERATUR

Amersbach, K., Löwenstein, A., Löwenstein, E.: Münch. Med. Wchschr. 1931, S. 1078.
Bessau, B.: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Busson, B.: Wien. klin. Wchschr. 1931, S. 407.
— Wien. klin. Wchschr. 1931, II, S. 1431.
— Med. Kl. 1932, I, S. 758.
Cohn: Sonderdruck der Med. Kl. 1932.
Ederle-Krieck: Deutsche Med. Wchschr. 1932, I.
Engel: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Fischer, A. u. Urgoiti: Beitr. z. Kl. d. Tbc. 76, S. 484 (1931).
Fitschen, E., Meyer, Kurt: Med. Klin. 1922, I (S. 730).
Hager, E.: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Hamburger, F.: Münch. Med. Wchschr. 1931, I, S. 487.
Holm: Acta tbc. sandinaw 6 (1932) S. 94.
— Bibl. Saeg. 124 (1932) S. 92.
Huebschmann: Pathol. Anatomie d. Tuberkulose. J. Springer Verlag 1928.
Jontofsohn: Z. f. Tbc. 61 (1931) S. 35.
Jousset: La semaine médicale 37 (1904).
Kadisch: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Kissmeyer-Löwenstein: Münch. Med. Wchschr. 1932, I, S. 626.
König: Die Tuberkulose der Knochen. Verlag Hirschwald, Berlin 1904.
Kren-Löwenstein: Wien. Klin. Wo. 1931, I, S. 405.
Lang: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Lewin: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Löwenstein, E.: Vorlesungen über Tbc., Verlag G. Fischer, 1920.
— Handbuch d. Tuberkulosetherapie, Urban u. Schwarzenberg 1923.
— Münch. Med. Wchschr. 1930, II, S. 1662.
— Deutsche med. Wchschr. 1930, I, S. 1010.
— Z. f. Bakt. I Orig. 120, S. 127, 1931.
— Med. Kl. 1931, II, S. 1010 u. 1669.
— Münch. Med. Wchschr. 1931, I, S. 261.
— Münch. Med. Wchschr. 1931, I, S. 1080.
— Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Manteufel: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Manteufel-Kottmann: Z. f. Immunforschung 74, 1932, S. 25.
Meller: Wiener Kl. Wchschr. 1932, I, S. 33.
Meyer, Kurt: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Popper, L.: Dtsche. Med. Wchschr. 1932, I, S. 89.
Popper, H. u. Schindler, W. - Bodart, F.: Wien. Kl. Wchschr. 1931, II, S. 1494.
Popper: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.
Popper, A., Schindler, W., Bodart, F.: Virchows Archiv 285, S. 789.
Rabinowitsch: Sonderdruck d. Med. Kl. 1932.

Reitter, C., Löwenstein, E: Wien. Kl. Wchschr. 1931, I, S. 410, 1932, I, S. 293.
— I. Münch. Med. Wchschr. 1930, II, S. 1522; II. 1931, I, S. 472; III. 1931, II, S. 2033.
— Wien. Kl. Wchschr. 1930, I, S. 604.
Russew, R.: Wien. Arch. f. inn. Med. 20, S. 231, 1930.
Saegler: Sonderdruck d. Med. Kl. 1922.
Sigon: Minerva Med. 1931, II (Torino), S. 597.
Villemins: Etudes sur la Tuberculeuse, Paris 1868.
Wessely, E. u. Löwenstein, E.: Beitrag z. Kl. d. Tbc. 76 (1931) S. 647.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. Dr. Manteufel für die freundliche Überlassung des Themas meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

LEBENSLAUF.

Ich wurde am 10. 8. 08 in Dortmund-Hombruch als Sohn des Lehrers August H e l m k e und seiner Frau Anna geb. Baumert geboren. In Düsseldorf besuchte ich das humanistische Hohenzollerngymnasium. Nach dem Abitur begann ich das Studium der Medizin und ging zunächst nach Innsbruck, dann nach Kiel, um hier das Physikum zu machen. Von meinen klinischen Semestern verbrachte ich eines in Wien, die anderen 5 an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf, wo ich auch am 22. Dezember 1932 das Staatsexamen bestand.